

① BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 30 34 273 A 1

⑤ Int. Cl. 3:
C 09 H 1/00

⑳ Aktenzeichen:
㉔ Anmeldetag:
㉕ Offenlegungstag:

P 30 34 273.5-43
11. 9. 80
2. 4. 81

US 4279812

㉓ Unionspriorität: ㉔ ㉕ ㉖
12.09.79 US 74738

㉗ Erfinder:
Cioca, Gheorghe, Belleville, N.J., US

㉙ Anmelder:
Seton Co., Newark, N.J., US

㉚ Vertreter:
Wuesthoff, F., Dr.-Ing.; Frhr.von Pechmann, E., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat.; Behrens, D., Dr.-Ing.; Goetz, R., Dipl.-Ing.
Dipl.-Wirtsch.-Ing., Pat.-Anw., 8000 München

㉛ Regeneriertes Kollagen und Verfahren zu dessen Herstellung

DE 30 34 273 A 1

DE 30 34 273 A 1

3034273

PATENTANWÄLTE

WUESTHOFF-V. PECHMANN-BEHRENS-GOETZ

PROFESSIONAL REPRESENTATIVES BEFORE THE EUROPEAN PATENT OFFICE
MANDATAIRES AGRÉÉS PRÈS L'OFFICE EUROPÉEN DES BREVETS

DR.-ING. FRANZ WUESTHOFF
DR. PHIL. FREDR. WUESTHOFF (1917-1956)
DIPLO.-ING. GERHARD PULS (1952-1971)
DIPLO.-CHEM. DR. E. FREIHERR VON PECHMANN
DR.-ING. DIETER BEHRENS
DIPLO.-ING.; DIPLO.-WIRTSCH.-ING. RUPERT GOETZ

1A-54 034

Anm.: SETON COMP.

D-8000 MÜNCHEN 90
SCHWEIGERSTRASSE 2

TELEFON: (089) 66 20 51

TELEGRAMM: PROTECTPATENT

TELEX: 524070

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Regeneriertes Kollagen aus makromolekularen rekonstituierten Fasern bzw. Fibrillen mit einem mittleren Molekulargewicht von 383 000 bis 460 000, das 4 bis 6 % Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 30 000 bis 60 000 und 8 bis 12 % Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 1 000 000 bis 1 500 000 enthält und nicht antigen wirkt.
2. Kollagen nach Anspruch 1, dadurch g e k e n n - z e i c h n e t , daß es vernetzt ist.
3. Kollagen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch g e - k e n n z e i c h n e t , daß es eine kleine Menge einer biologisch wirksamen Substanz enthält.
4. Kollagen nach Anspruch 3, dadurch g e k e n n - z e i c h n e t , daß die biologisch wirksame Substanz in Hormon, ein Spermizid oder ein Antibiotikum ist.
5. Verfahren zur Herstellung des Kollagens nach Anspruch 1 bis 4, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß man

/2

130014/1208

11.09.80

3034273

1A-54 034

- 3 -

10. Verfahren nach Anspruch 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Waschstufe mindestens 4 h mit destilliertem Wasser behandelt, das Wasser abdekantiert und die Behandlung insgesamt viermal wiederholt.

11. Verfahren nach Anspruch 5 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man das Kollagen vor dem Lösen durch Waschen mit einer sauren Lösung neutralisiert.

12. Verfahren nach Anspruch 5 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man das Kollagen in einer sauren wäßrigen Lösung löst.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Säure in der wäßrigen Lösung Ascorbinsäure verwendet.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Lösung einen pH-Wert von 3 bis 4 besitzt.

15. Verfahren nach Anspruch 5 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man von Rinder-Corium ausgeht.

16. Verfahren nach Anspruch 5 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man als biologisch wirksame Substanz ein Hormon, ein Antibiotikum oder ein Spermizid verwendet.

6249

130014/1208

1A-54 034

Anm.: SETON COMP.

B e s c h r e i b u n g

Regeneriertes Kollagen und Verfahren zu dessen Herstellung

Die Erfindung bezieht sich auf Kollagen und betrifft makromolekulare rekonstituierte Kollagenfasern.

Der Ausdruck "natürliches, unlösliches Kollagen", wie er hier verwendet wird, bedeutet Kollagen, das in wäßriger Alkali- oder sonstiger anorganischer Salzlösung nicht gelöst werden kann ohne chemische Modifizierung und umfaßt Häute (Felle und Leder), Spaltleder u.a. Außenhäute von Säugetieren oder Reptilien. Insbesondere bezieht sich "natürliches, unlösliches Kollagen" auf das Korium, das die Zwischenschicht der Haut von Rindern zwischen der Haarseite und der Fleischseite.

Kollagen bildet das Bindegewebe und ist das hauptsächliche Faserprotein bei höheren Wirbeltieren. Kollagen liegt in natürlichem Zustand in Form einer dreikettigen Helix (Tripel-helix) vor mit konstanter Periodizität zwischen den drei parallel laufenden (aligned) Ketten. Die Konfiguration der Tripel-helix von Kollagen wird manchmal als

11.09.80

3034273

1A-54 034

- 2 -

Faser bzw. Fibrille bezeichnet und die Fibrillen ordnen sich mit*axialen Periodizität von ungefähr 64 nm (640 Å) an.

* einer

Obwohl es verschiedene Arten von Kollagen gibt, wird die hauptsächlich vorkommende Art als "Typ I" bezeichnet, das das Hauptkollagen der Haut, Knochen und Sehnen darstellt. Das Kollagen vom Typ I besitzt die folgende Kettenzusammensetzung $[\alpha 1(I)_2\alpha 2]$. Die $\alpha 1(I)$ und $\alpha 2$ Ketten sind homologe.

Bei jungen Tieren liegt nur eine geringe intermolekulare und interfibrilläre Vernetzung vor, was zu einer gewissen Löslichkeit des Kollagens führt. Bei fortschreitendem Alterungsprozeß nimmt jedoch die intermolekulare und interfibrilläre Vernetzung zu, wodurch das Kollagen unlöslich wird.

Die Verwendung von Kollagen in im wesentlichen reiner Form ist bekannt, z.B. zur Behandlung und Abdeckung von Brandwunden (US-PS 3 939 831 und 3 514 518) und ähnliche medizinische Anwendungsgebiete (US-PS 3 157 524 und 3 628 974) ebenso wie seine Verwendung als Nahrungsmittelzusatz.

Während es bekannt ist, daß Kollagen durch Depolymerisierung von natürlichem unlöslichem Kollagen mit anschließender Rekonstitution gereinigt werden kann, sind die dabei erzielbaren Ausbeuten verhältnismäßig gering und das entstehende Produkt muß nicht mehr biologisch aktiv sein.

In der US-PS 3 637 642 ist beispielhaft ein Verfahren zum Lösung von unlöslichem Kollagen und Regenerieren der Faser angegeben.

/3

130014/1208

Ferner haben Kollagen und ähnliche Substanzen auf dem Gebiet der Nahrungsmittel, Kosmetika und Pharmazeutika Anwendung gefunden.

Es sind noch andere Methoden zum Löslichmachen und Rekonstituieren von Kollagen bekannt unter Anwendung von Enzymen, die die intra- und interfibrillären Bindungen lösen, wie in der US-PS 3 034 852 angegeben. Außerdem sind Verfahren zur Umwandlung von faserigen Kollagenmassen zu einem Bahnmateriale bekannt (US-PS 2 934 447 und 2 934 446).

Nach den US-PSen 3 939 831 und 3 742 955 können Materialien zum Abdecken von Wunden aus Kollagen hergestellt werden, in dem Antibiotika und ähnliches dispergiert ist, um die Heilung der verletzten bzw. verbrannten Haut zu unterstützen.

Es ist Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zu entwickeln, um Kollagenfasern bzw. Fibrillen zu lösen und zu regenerieren durch das im wesentlichen alle Verunreinigungen aus dem Kollagen entfernt werden und mit dessen Hilfe ein im wesentlichen reines Kollagenprodukt erhalten wird, das biologisch aktiv ist und im wesentlichen nicht antigen wirkt.

Makromolekulares rekonstituiertes Kollagen wird erfindungsgemäß hergestellt durch mindestens 24 h langes Behandeln von natürlichem unlöslichem Kollagen mit einer wässrigen Lösung, umfassend ein Alkalisulfat und ein Alkalihydroxid, um die in dem natürlichen unlöslichen Kollagen suspendierte Fette zu verseifen. Das fettfreie Kollagen wird dann mindestens 4 h mit einer wässrigen Lösung behandelt, umfassend ein Alkalisulfat, um die Zwischenfaserbindungen zwischen den einzelnen Polypeptidketten zu

11.09.80

3034273

1A-54 034

- 4 -

lösen. Das Kollagen wird dann in einer wäßrigen sauren Lösung gelöst und mit einer Geschwindigkeit von -18 bis -24°C/h und vorzugsweise -20°C/h auf eine Temperatur von -60 bis -70°C gefroren. Das gefrorene Kollagen wird bei einem Druck von $1,3 \cdot 10^{-6}$ bis $1,3 \cdot 10^{-8}$ bar (10^{-3} bis 10^{-5} torr) mindestens 16 h im Vakuum getrocknet, um ein biologisch aktives Kollagen zu erhalten. Vor dem Einfrieren können verschiedene biologisch aktive Stoffe zu der wäßrigen Lösung zugegeben werden. Das Kollagenprodukt kann dann einem Tier implantiert oder auf ähnliche Weise appliziert werden, wobei das Arzneimittel langsam freigesetzt wird. Das Produkt kann in dem biologischen System verbleiben und löst sich langsam aufgrund des enzymatischen Abbaus und durch andere biologische Prozesse auf.

Erfindungsgemäß geeignete Alkalisulfate sind z.B. Natriumsulfat, Kaliumsulfat sowie Erdalkalisulfate wie Calciumsulfat, Magnesiumsulfat und ähnliche. Das bevorzugte Alkalisulfat ist Natriumsulfat. Die Alkalihydroxide, die erfindungsgemäß angewandt werden können, sind u.a. Natrium- und Kaliumhydroxid und insbesondere Natriumhydroxid. Erdalkalihydroxide wie Calciumhydroxid und Magnesiumhydroxid können teilweise anstelle der Alkalihydroxide angewandt werden. Es muß jedoch ausreichend Kalium- und/oder Natriumhydroxid vorhanden sein.

Die wäßrige Lösung des Alkalisulfats und Alkalihydroxids ist 1 bis 2,5 m, bezogen auf Alkalihydroxid und 0,5 bis 1 m, bezogen auf Alkalisulfat und 0,1 bis 0,5 m, bezogen auf andere Salzbestandteile. Insbesondere ist sie 2,0 bis 2,5 m, bezogen auf Alkalihydroxid, 0,9 bis 1,0 m auf Alkalisulfat und 0,1 bis 0,2 m auf andere Bestandteile. Das Alkalihydroxid und Alkalisulfat sollten zu Beginn einen pH-Wert von ungefähr 12 bis 13 besitzen.

* bzw. der Formkörper

/5

130014/1208

11.09.80

3034273

1A-54 034

- 5 -

Die anderen Salzbestandteile sind u.a. Alkalichlorid wie Natrium- und Kaliumchlorid, Erdalkalichloride wie Magnesium- und Calciumchlorid und Ähnliches. Es sollte sorgfältig darauf geachtet werden, das Alkalisulfat in der entsprechenden Menge zu dem Alkalihydroxid zuzugeben, um eine vollständige Verseifung der in dem natürlichen unlöslichen Kollagen enthaltenen Fette zu erreichen während die ursprünglichen (nativen) Eigenschaften des Kollagens beibehalten werden und um das Quellen der Kollagenfasern bzw. Fibrillen zu steuern. Wenn zuviel Natriumhydroxid angewandt wird, wird das Kollagen denaturiert und die intermolekularen Bindungen gelöst. Wenn nicht genügend Natriumhydroxid angewandt wird, bleiben in dem Kollagenprodukt Verunreinigungen wie Fette u.a. hydrolysisierbare Substanzen enthalten, die unerwünscht sind.

Bei Behandlung des natürlichen unlöslichen Kollagens mit der wässrigen Lösung des Alkali- (bzw. Erdalkali)-sulfats und Alkalihydroxids sollte das natürliche unlösliche Kollagen in Stücke geschnitten werden, die ausreichend klein sind, so daß die wässrige Lösung darin eindringen und reagieren kann. Die natürlichen Kollagenstücke sollten ungefähr 10 cm^3 oder kleiner und insbesondere 5 cm^3 oder kleiner sein. Außerdem sollte die Behandlung mindestens 48 h bei Raumtemperatur stattfinden, um alle in dem natürlichen unlöslichen Kollagen enthaltenen Fette vollständig zu verseifen und eine gleichmäßige Quellung der Kollagenfasern zu erreichen. Es sollte darauf geachtet werden, daß die Anfangsbehandlung mit dem Alkalisulfat und dem Alkalihydroxid nicht zu lang stattfindet oder die Polypeptidketten werden angegriffen und das Kollagen wird denaturiert. Wenn z.B. natürliches unlösliches Kollagen in Stücke von 5 cm^3 geschnitten wird, sollte die anfängliche Behandlung nicht mehr als 96 h betragen, da sonst die Kollagenfasern zu nieder-molekularen Bestandteilen abgebaut und denaturiert

130014/1208

/6

11 09 00

3034273

1A-54 034

- 6 -

werden. Nach der Anfangsbehandlung wird das natürliche unlösliche Kollagen sehr weich und transparent.

Nach Entfernung der ersten Behandlungslösung wird das Kollagen mit einer Lösung eines Alkalisulfats oder Erdalkalisulfats oder einer Kombination davon bei einem im wesentlichen neutralen pH-Wert behandelt. Die Konzentration an Sulfat sollte ungefähr 0,5 bis 1,0 m sein. Andere Salze wie Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid und ähnliche können zu dieser Salzlösung zugesetzt werden so lange eine ausreichende Menge Alkalisulfat, vorzugsweise Natriumsulfat, angewandt wird, um die Zwischenfaserbindungen des Kollagens zu stabilisieren. Diese Behandlung mit dem Alkalisalz sollte mindestens 4 h durchgeführt werden.

Vorzugsweise wird das Kollagen dann mit einer sauren wäßrigen Lösung mit einem pH-Wert zwischen 3 und 4 neutralisiert. Die zur Bildung der wäßrigen Lösung angewandten Säuren sind üblicherweise Borsäure, Weinsäure, Essigsäure oder ähnliches. Das Waschen wird ungefähr 6 h durchgeführt, um restliche Salze und basische Bestandteile zu entfernen. Der pH-Wert des Kollagens beträgt anschließend ungefähr 7.

Das Kollagen wird dann mit Leitungswasser gewaschen. Um restliche Salze innerhalb des Kollagens zu entfernen, wird es mehrere Male mit destilliertem Wasser gewaschen. Vorzugsweise dauert jeder Waschzyklus ungefähr 4 h. Nach jedem 4 h Zyklus wird das Wasser abdekantiert und frisches destilliertes Wasser zugegeben. Normalerweise sind 4 bis 7 Waschzyklen erforderlich, um die restlichen Salze zu entfernen.

Das Kollagen wird dann in einer wäßrigen sauren Lösung gelöst und vorzugsweise in eine Lösung von 1 bis 1,5 Gew.-%

130014/1208

/7

11.09.80

3034273

1A-54 034

- 7 -

Kollagen hergestellt. Die zum Lösen der Kollagenfasern geeigneten Säuren sind die schwachen organischen Säuren wie Essigsäure, Citronensäure, Milchsäure, Ascorbinsäure und Weinsäure. Vorzugsweise wird der pH-Wert auf einen Wert unter 4 eingestellt, um eine gute Löslichkeit zu erhalten. Im Falle von Ascorbinsäure reicht eine 1 %-ige Lösung aus und im Falle von Essig- oder Weinsäure eine 0,5 %-ige Lösung. Der pH-Wert der wäßrigen Lösung sollte ungefähr 3 bis 4 sein.

Die Kollagenlösung wird dann gefroren, wobei die Temperatur mit einer Geschwindigkeit von -18 bis -24°C pro h verringert wird bis auf einen Wert von -60 bis -70°C .

Das Einfrieren mit einer Geschwindigkeit von ungefähr -18 bis -24° pro h ist erforderlich, damit die entstehenden Eiskristalle außerordentlich klein werden und die Kollagenketten nicht nennenswert auflösen, was zu einer Verringerung des Molekulargewichts des entstehenden Kollagenproduktes führen würde.

Um die gewünschte Geschwindigkeit beim Einfrieren zu erreichen, wird die Kollagenlösung in eine Gefriervorrichtung von -60 bis -70°C gegeben.

Die gefrorene Lösung wird dann in eine Gefrier-Trocken-Vorrichtung mit einer Anfangstemperatur von -60 bis -70°C gegeben und die Flüssigkeit bei $1,3 \cdot 10^{-6}$ bis $1,3 \cdot 10^{-8}$ bar sublimiert. Das Gefrier-Trocknen erfordert ungefähr 12 bis 24 h bei einer Endtemperatur von 30°C .

Obwohl eine extreme Zerstörung der Kollagenketten durch das Gefrieren vermieden werden soll, ist ein gewisser Abbau durch die tiefe Temperatur notwendig, um reaktionsfähige und sich verbindende Stellen zu schaffen, die zu

/8

130014/1208

11.00.80

3034273

1A-54 034

- 8 -

einer Vernetzung führen und damit zu einer erhöhten mechanischen und enzymatischen Stabilität des Endproduktes und für die Kombination mit anderen Zusätzen, die in dem Kollagen enthalten sein sollen.

Das erfindungsgemäß hergestellte Kollagen besitzt ein mittleres Molekulargewicht von ungefähr 450 000 und eine axiale Periodizität zwischen den Fibrillen der Tripelhelix von ungefähr 75 bis 85 nm (750 bis 850 Å) und insbesondere ungefähr 80 nm im Gegensatz zu Tropokollagen mit ungefähr 64 nm. Überraschender Weise hat es sich gezeigt, daß das erfindungsgemäß hergestellte bzw. gereinigte Kollagen im wesentlichen die gleiche biologische Aktivität besitzt wie natürliches Kollagen, das mit Hilfe langwieriger und mühsamer Verfahren gereinigt worden ist.

Das erfindungsgemäß hergestellte Produkt ist eine schwammige zähe Masse.

Das mittlere Molekulargewicht von erfindungsgemäß hergestelltem Kollagen beträgt 383 000 bis 460 000 verglichen mit 300 000 für Tropokollagen. Das erfindungsgemäß hergestellte Kollagen enthält einen Anteil von 4 bis 6 % Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 30 000 bis 60 000 und 8 bis 12 % mit einem Molekulargewicht von 1 000 000 bis 1 500 000.

Wie oben gesagt, können biologisch wirksame Substanzen zu der Kollagenlösung oder Dispersion vor dem Einfrieren zugegeben werden. Diese Substanzen können Arzneimittel oder ähnliches sein. Da das erfindungsgemäß hergestellte Kollagenprodukt dem natürlichen oder rekonstituierten Kollagen sehr nahe kommt, kommt die Abgabe der biologisch wirksamen Substanz aus dem Kollagen der Absorption des Materials durch ein biologisches System nahe, in das Kollagen implantiert oder in dem es enthalten ist.

130014/1208

/9

11.09.80

3034273

1A-54 034

- 9 -

Es wird angenommen, daß die Trennung der Polypeptidketten während des Gefrierens zur Bildung von Resten führt, die sich mit bestimmten Arzneimitteln verbinden und so in vivo freigesetzt werden können. Wenn Kollagen, indem ein Arzneimittel enthalten ist, implantiert wird und das Arzneimittel verbraucht wird, löst sich das Kollagen langsam und/oder wird enzymatisch abgebaut oder durch einen anderen biologischen Prozeß. Das Implantat muß daher nicht entfernt werden.

Eine spezielle Anwendungsart der erfindungsgemäß hergestellten Kollagenprodukte liegt in der Blockierung des Sexualzyklus bei Tieren. Ein geeignetes Hormon wie Chlormadinonacetat, Hydroxyprogesteron-caproat, Medroxyprogesteron, Norethindron, Norethynodrel, Progesteron, 3-Äthylendioxy-17-acetoxy-6-methyl-pregn-5-en-20-on und ähnliches wird vor dem Einfrieren zu der Kollagenlösung oder Dispersion gegeben. Das Hormon wird in einer wirksamen Menge zugegeben, um den Sexualzyklus zu blockieren, vorzugsweise in einer Menge von 1 Teil auf 40 000 Teile Kollagenlösung bis zu 1 Teil auf 50 000 Teile Kollagenlösung.

Der aus dem Kollagen hergestellte Formkörper wird in den Uterus des Tieres eingesetzt. Nach 14 bis 18 Tagen ist das Hormon aus dem Kollagenformkörper abgegeben. 2 bis 7 Tage nach Beendigung der Hormongabe tritt verstärkt Brunst auf und das Tier kann dann gedeckt werden. Es kann zu diesem Zeitpunkt auch künstlich besamt werden.

Das erfindungsgemäß hergestellte Kollagen kann auch Antibiotika wie Penicillin, Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Chloramphenicol, Sulfonamid und ähnliches zusammen mit dem Hormon enthalten, um während der Besamung und anschließenden Trächtigkeit eine Infektion zu vermeiden.

130014/1208

/10

110000

3034273

1A-54 034

- 10 -

2 bis 14 Tage nach dem Einsetzen des Kollagenformkörpers beginnt der enzymatische Abbau des Kollagens. Ferner kann zu dem Kollagen Glutaraldehyd zugesetzt werden, um die für den biologischen Abbau erforderliche Zeit zu erhöhen.

Bei einer anderen Anwendungsform der erfindungsgemäß hergestellten Formkörper wird ein Spermeizid (wie Nonylphenoxypolyoxyäthylenäthanol) auf die gleiche Weise, wie es für das Hormon angegeben ist, zu der Kollagenlösung zugesetzt. Der Kollagenformkörper kann dann in die Scheide eingeführt werden und das Spermeizid tötet die in die Scheide gelangenden Spermien ab und verhindert damit eine Empfängnis. Die in der Scheide vorhandenen Enzyme lösen das Kollagen langsam auf, so daß eine Entfernung des Formkörpers nicht erforderlich ist. Wie oben angegeben können außerdem Glutaraldehyd u.a. Vernetzungsmittel zugesetzt werden, um die Abbaugeschwindigkeit des Kollagens in vivo zu verringern.

Es ist ferner möglich, der Kollagenlösung vor dem Einfrieren Antibiotika Bacteriostatica oder Bacterizide zuzusetzen. Nach dem Gefrier-Trocknen kann die Kollagenmasse zur Behandlung von Verbrennungen oder ähnlichem angewandt werden.

Allgemein gesagt können verschiedene Arzneimittel der Kollagendispersion zugesetzt werden und ein aus dem Kollagen hergestellter Formkörper kann implantiert bzw. eingeführt werden, um eine biologische, physiologische oder psychologische Wirkung in biologischen Systemen auszuüben.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

/11

130014/1208

Beispiel 1

1 kg Corium von rohen Kuhhäuten wurde in Stücke von 5 cm³ geschnitten. Diese Stücke wurden in einem Bottich mit einer Lösung der folgenden Zusammensetzung behandelt.

<u>Bestandteile</u>	<u>Menge</u>
Wasser	3000 ml
Calciumhydroxid	150 g
Kaliumhydroxid	50 g
Natriumhydroxid	100 g
Natriumsulfat	144 g
Natriumchlorid	100 g
Kaliumchlorid	200 g
Calciumsulfat	100 g.

Das natürliche unlösliche Kollagen wurde in der oben angegebenen Lösung 48 h unter Rühren behandelt. Die Beobachtung und Untersuchung nach dieser Behandlung zeigte eine Verseifung aller Fette und einen gleichmäßigen Quellungsgrad des Kollagens. Das Corium war sehr weich, transparent und porös geworden.

Die Behandlungsflüssigkeit wurde abgelassen und eine zweite Lösung der folgenden Zusammensetzung in den Behälter gegeben.

<u>Bestandteile</u>	<u>Menge</u>
Wasser	6000 ml
Natriumsulfat	144 g
Natriumchlorid	100 g
Kaliumchlorid	100 g
Calciumsulfat	100 g.

11 09 00

3034273

1A-54 034

- 12 -

Das Corium wurde mindestens 4 h zur Stabilisierung der Zwischenfaserbindungen mit der Natriumsulfatlösung behandelt.

Die zweite Lösung wurde abgezogen und eine Lösung von 3000 ml Wasser und 90 g Borsäure zum Waschen und Ansäuern des zweimal behandelten Coriums zugegeben. Diese Behandlung nahm 6 h in Anspruch bis das Kollagen einen neutralen pH-Wert hatte. Das Kollagen wurde dann von der Flüssigkeit abgetrennt und mit 10 l Leitungswasser 4 h behandelt. Das Leitungswasser wurde abgezogen und das Kollagen erneut mit 15 l destilliertem Wasser mindestens 4 h behandelt, um restliche Salze auszuwaschen und das Wasser wurde abdekantiert und 15 l destilliertes Wasser zugegeben. Dieses Verfahren wurde sechs Mal durchgeführt. Das Kollagen wurde in 10 l 1 %-iger Ascorbinsäure gelöst und bis zur Homogenität gerührt. Die Kollagenlösung wurde in 1 cm hohe Formen mit einem Durchmesser von 2,5 cm gegossen. Die Formen wurden bei einer Temperatur von -60 bis -70°C gefroren, um eine Temperaturverringerung des Kollagens von 20°C pro h bis auf eine Temperatur von -60°C zu erreichen. Das Kollagen wurde dann mit einer Anfangstemperatur von -60°C und einer Endtemperatur von 30°C nach 16 h gefriergetrocknet.

Das entsprechend Beispiel 1 hergestellte Kollagen besaß ein mittleres Molekulargewicht von 450 000. Die axiale Periode zwischen den Kollagenfibrillen betrug ungefähr 80 nm.

Das nach diesem Beispiel hergestellte Kollagen konnte leicht durch Kollagenase abgebaut werden und zeigte bei der Untersuchung keine antigene Wirkung.

Das entsprechend Beispiel 1 hergestellte Kollagen besaß gut mechanische Eigenschaften einschließlich Elastizität, Kompressibilität und Weichheit.

130014/1208

/13

110900

3034273

1A-54 034

- 13 -

Beispiel 2

Das Beispiel 1 wurde wiederholt mit der Ausnahme, daß 0,025 g Medroxyprogesteron-acetat zu 1 000 ml der Kollagenlösung vor dem Eingießen in die Formen zugegeben wurden.

Die Kollagen-Tabletten (pellets), in denen das Hormon gleichmäßig dispergiert war, wurden in den Uterus von Kühen eingesetzt, um Brunst zu erzeugen. Aufgrund der (Komplex)-Bindung des Kollagens mit dem Hormon wurde das Hormon innerhalb eines Zeitraums von 2-14 Tagen abgegeben. Nach dieser Zeit wurden die Kühe künstlich besamt. Die Kollagen-Tablette blieb in dem Uterus und löste sich langsam durch enzymatischen Abbau auf.

Beispiel 3

Das Beispiel 2 wurde wiederholt mit der Ausnahme, daß vor dem Einfrieren 0,25 g Chlormycetin zu der Kollagen-dispersion zugesetzt wurden.

Das Chlormycetin wirkte zur Verhütung einer Infektion der Kuh während der Besamung und anschließenden Trächtigkeit.